

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the U.S. Postal Service with sufficient postage as First Class Mail, in an envelope addressed to: Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 on the date shown below.

Dated: June 17, 2003

Signature: 

(Nabeela R. McMillian)



Docket No.: 29473/11899
(PATENT)

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Patent Application of: Mühlradt *et al.*

Application No.: 09/716,778

Group Art Unit: 1614

Filed: November 20, 2000

Examiner: Not Yet Assigned

For: USE OF LIPOPROTEINS FOR WOUND
TREATMENT

RECEIVED

TRANSMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT

JUN 20 2003

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

TECH CENTER 1600/2900

Dear Sir:

Enclosed herewith is a certified copy of European Patent Application No. EP 198 22 820.1, filed May 20, 1998, upon which priority of the instant application is claimed under 35 U.S.C. §119.

Dated: June 17, 2003

Respectfully submitted,

By 

Nabeela R. McMillian

Registration No.: 43,363
MARSHALL, GERSTEIN & BORUN
233 S. Wacker Drive, Suite 6300
Sears Tower
Chicago, Illinois 60606-6357
(312) 474-6300
Attorneys for Applicant



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 198 22 820.1

Anmeldetag: 20. Mai 1998

Anmelder/Inhaber: Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH
(GBF), Braunschweig/DE

Bezeichnung: Pharmazeutisches Präparat zur Wundbehandlung

IPC: A 61 K 38/16

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der
ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 28. September 2001
Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized 'H' followed by a series of loops and a long vertical stroke.

Hiebinger

18. Mai 1998/hl

Unser Zeichen: 9256
Neue deutsche Patentanmeldung
Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (GBF)
Mühlradt & Deiters; Wundbehandlung

Pharmazeutisches Präparat zur Wundbehandlung

Stand der Technik

Man kann 5 Stadien der Wundheilung beschreiben:

1. Blutgerinnung und Freisetzung von Mediatoren aus Thrombozyten (nach einigen Minuten),
2. Einstrom von Leukozyten, d. h. anfangs Granulozyten, später Makrophagen und Lymphozyten (Tag 1-3),
3. Vermehrung diverser Zellen wie Fibroblasten, Endo- und Epithelzellen (Tag 3-7),
4. Wundkontraktion (Tag 7-9) und
5. Umbau des Narbengewebes (bis zu einem Jahr)

Das Einströmen von Granulozyten in Phase 2 bewirkt Aufnahme von Debris und Abtöten von infektiösen Erregern, eine Aufgabe, die

auch von Makrophagen übernommen wird. Die Makrophagen sind darüberhinaus die Quelle einer Reihe von Mediatoren wie Signalpeptiden, Wachstumsfaktoren und Zytokinen, wie Transforming Growth Factor (TGF β 1), Platelet Derived Growth Factor (PDGF-AA und -BB), Fibroblast Growth Factor (FGF2) und zur Familie der Epidermal Growth Factors (EGF) gehöriem TGF- α . Makrophagen sezernieren auch Interleukin-1 (IL-1), das indirekt in Fibroblasten FGF7 induziert. Alle diese Faktoren sind an unterschiedlichen Stadien der Wundheilung beteiligt bzw. dafür unerläßlich. Ohne Makrophagen als Quelle dafür ist eine Wundheilung stark verzögert bzw. nicht möglich.

Problematik:

Obwohl es möglich ist, einige der oben erwähnten Mediatoren in isolierter Form bei der Wundheilung einzusetzen, ist dies jedoch schwierig, da die meisten dieser Peptide eine Halbwertszeit von nur wenigen Minuten haben. Weitere Schwierigkeiten bestehen darin, daß der natürliche Zeitpunkt des Erscheinens der unterschiedlichen Mediatoren, die optimale Dosierung und die Interaktion dieser Substanzen nicht im Einzelnen bekannt sind, geschweige denn bei Applikation kontrolliert werden können.

Eine Komplikation auch chirurgischer Wunden können Infektionen darstellen, die im allgemeinen zu verzögerter Wundheilung und erhöhter Narbenbildung führen, was besonders bei kosmetischen Operationen problematisch ist. Eine prophylaktische Abdeckung mit Antibiotika ist angesichts der Resistenzprobleme und eventueller allergischer Reaktionen vielerorts nicht mehr üblich. Bei bestimmten Patientengruppen, z. B. Diabetikern oder älteren Patienten, ist Wundheilung verzögert.

Lösung

Mykoplasmen haben natürlicherweise die Eigenschaft, am Infektionsort, z. B. der Lunge, zum Einströmen von Leukozyten zu führen. Wie wir jetzt zeigen konnten, ist diese Eigenschaft mit dem Vorhandensein einer bestimmten Klasse von Lipopeptiden assoziiert, die dadurch charakterisiert ist, daß sie N-terminal eine Dihydroxypropyl-cystein-Gruppe mit zwei esterartig gebundenen, langkettigen Fettsäuren aufweist (Mühlradt et al. in J. Exp. Med., 185 (1997) 1951). Derartige Lipopeptide haben außer der bereits beschriebenen Eigenschaft, Makrophagen in vitro zur Freisetzung von Zytokinen und Prostaglandinen zu stimulieren (1 bis 3), auch die von uns neu gefundene Fähigkeit, in vivo hohe Titer an den Chemokinen MIP-1 α und MIP-2 zu induzieren.

Insbesondere haben einige Klone von *Mycoplasma fermentans* einen erhöhten Anteil an diesen Lipopeptiden/Lipoproteinen, die auch synthetisch zugänglich sind (4 bis 5). In der Tiermedizin können solche hitze-getöteten Mykoplasmenklone, bzw. in der Humanmedizin reine, synthetisch hergestellte Lipopeptide sowie Lipopeptide, die in Liposomen eingebaut wurden, z. B. in Form von Salben oder Lotionen eingesetzt werden. Auf Wunden aufgebracht sollen derartige Präparate den natürlichen Einstrom von Granulozyten und Makrophagen erhöhen und beschleunigen und somit einer Infektion vorbeugen sowie durch Anregung der Biosynthese an der Wundheilung beteiligter Mediatoren in der natürlichen Reihenfolge und Konzentration die Wundheilung erleichtern und beschleunigen. Die in vivo-Wirksamkeit derartiger Lipopeptide aus Mykoplasmen ist überraschend und neu, da Applikation von anderen bakteriellen Lipopeptiden und ihrer synthetischen Analoga im Tierversuch keine Wirkung zeigen (S. Hausschildt et al. in FEMS Immunol. Med. Microbiol., 8 (1994) 77).

Gemäß einer Ausführungsform wird die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe durch ein pharmazeutisches Präparat zur Tier- oder Human-Wundbehandlung gelöst, enthaltend ein oder bestehend aus einem physiologisch verträglichen Lipopeptid oder Lipoprotein, das N-terminal eine Dihydroxypropyl-cystein-Gruppe mit zwei esterartig gebundenen gegebenenfalls langkettigen Fettsäuren trägt, die gleich oder verschieden sind.

Vorzugsweise ist das Lipopeptid wasserlöslich.

Das Lipopeptid oder Lipoprotein kann die folgende Aminosäuresequenz (I):

DhcGNNDESNISFKEK

oder eine Aminosäuresequenz aufweisen, die mit der Sequenz (I) mit der Ausnahme identisch ist, daß N-terminal die Aminosäuren an Positionen 2 und gegebenenfalls 3 fehlen und/oder C-terminal 1 bis 2 Aminosäuren deletiert sind.

Ferner kann es sich bei dem Lipopeptid um ein S-(2,3-Dihydroxypropyl)-cystein-Peptid handeln, wobei die beiden Fettsäurereste die Formel R-CO- besitzen, wobei R eine C₇₋₂₅-Alkyl-, C₇₋₂₅-Alkenyl- oder C₇₋₂₅-Alkynylgruppe ist, wobei ungesättigte Reste vorzugsweise in cis-Konfiguration vorliegen.

Das erfindungsgemäße Präparat kann in Form einer Salbe, einer Lotion, einer wäßrigen Suspension oder eines Pflasters vorliegen.

Ferner kann das Lipopeptid oder Lipoprotein in ein Liposom eingebaut sein.

Ferner kann das Lipopeptid oder Lipoprotein synthetisch hergestellt oder aus einem Mykoplasma-Klon isoliert worden sein, insbesondere aus einem Mykoplasma fermentans-Klon.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft ein pharmazeutisches Präparat zur Tier-Wundbehandlung, enthaltend einen oder bestehend aus einem abgetöteten Mykoplasma-Klon.

Bei dem abgetöteten Mykoplasma-Klon kann es sich um einen hitzegetöteten Mykoplasma-Klon und/oder einen Mykoplasma fermentans-Klon handeln.

Mykoplasmen- oder synthetische Lipopeptidpräparate wären kostengünstig herstellbar und würden den natürlichen Ablauf der Wundheilung verstärken, ohne prinzipiell in den komplizierten Regelmechanismus verschiedener Mediatoren der Wundheilung einzugreifen. Darüberhinaus würde eine Infektionsprophylaxe bewirkt, ohne daß Antibiotika oder andere, die Wundheilung z. B. schädigende Bakteriostatika eingesetzt werden müssten. Solche Lipopeptidpräparate wären auch bei Gesichtswunden einsetzbar, bei denen aus Gründen der Toxizität der üblichen Bakteriostatika bei Gefahr des Kontakts mit Augen oder dem Nasen- und Oralbereich Vorsicht geboten ist. Bei topischer Anwendung ist die Gefahr von systemischen Wirkungen wie Fieber so gut wie ausgeschlossen.

Nachstehend wird die Erfindung durch Abbildungen und Beispiele näher erläutert. Es zeigen:

Abb. 1 den Einfluß einer Injektion M. fermentans auf die Leukozytenzahl im Peritoneum nach unterschiedlichen Zeiten;

Abb. 2 den Einfluß einer Injektion leerer bzw. MALP-2-haltiger Liposomen auf die Leukozytenzahl im Peritoneum nach unterschiedlichen Zeiten;

Abb. 3 den Einfluß einer Injektion von MALP-2 auf die Leukozytenzahl im Peritoneum nach unterschiedlichen Zeiten.

Beispiel 1:

Als Beispiel der Wirksamkeit von hitze-getöteten Mykoplasmen, synthetischen Lipopeptiden oder Liposomen, in die derartige Lipopeptide inkorporiert wurden, dient uns das Modell des Einstroms von Granulozyten und Makrophagen in das Peritoneum (Bauchfell) der Maus. Es werden NMRI-Auszuchtmäuse als Versuchstiere verwendet, um genetische Besonderheiten auszuschließen.

Mykoplasmen werden kloniert, gezüchtet, geerntet und auf Makrophagen stimulierende Aktivität geprüft (6). Das Lipopeptid MALP-2 wurde gemäß Mühlradt et al. in loc. cit. synthetisiert. MALP-haltige Liposomen werden wie folgt konstruiert: Die in Chloroform bzw. Chloroform/Methanol (1+1) gelösten Lipide (Phosphatidglycerin, Phosphatidylserin, Cholesterol, NBD-PE, molares Verhältnis 1,08 : 1 : 0,25 : 0,005) werden mit dem in 2-Propanol/H₂O (1+1) gelösten MALP-2 zusammenpipettiert und mittels Rotationsverdampfer eingeengt. Vollständige Trocknung des Lipidfilms erfolgt über Nacht unter der Sterilbank. Resuspension des getrockneten Lipidfilms in Octylglucosid (100 mM in 0,05 M Tris-gepuffertem NaCl, pH 7), 30 min. 37 °C im Wasserbad. Dialyse gegen das 50-fache Volumen NaCl (0,1 M Tris-gepuffert, pH 7) bei Raumtemperatur, 2 x Wechsel des Außendialysats nach jeweils 24 Stunden.

Die erhaltene Liposomensuspension wird insgesamt 3 x mit NaCl gewaschen (Zentrifugation 30 min. bei 47800 g, 4 °C) und im Anschluß daran in NaCl resuspendiert.

Zum Zeitpunkt 0 werden die folgenden Präparate steril und in physiologischer Kochsalzlösung in den Bauchraum der Versuchstiere injiziert. Gruppen von 3 Mäusen werden nach unterschiedlichen Zeiten getötet, der Bauchraum mit 1,2 ml steriler Kochsalzlösung gespült und die Leukozytenzahl und -zusammensetzung in dieser Zellsuspension bestimmt.

Die **Abb. 1** zeigt die Wirkung hitze-getöteter Mykoplasmen, die **Abb. 2** die von Liposomen, in die MALP-2 integriert wurde bzw. die von „leeren“ Kontrollliposomen und die **Abb. 3** die Wirkung von reinem synthetischen MALP-2 auf die Leukozytenzahl im Peritoneum.

In der **Tabelle 1** sind die wesentlichen Werte, d. h. der nach Injektion der Präparate erfolgende Anstieg an Granulozyten und der spätere Anstieg an Makrophagen zusammengefaßt. Es ergibt sich eine Zunahme gegenüber unbehandelten Kontrolltieren von Granulozyten um das etwa Hunderfache, während die Makrophagen nach 3 Tagen um das Doppelte bis Dreifache zugenommen haben.

Misst man 2 Std. nach Applikation der Mykoplasmen oder Lipopeptidpräparate die chemotaktisch wirksamen Chemokine MIP-1 α und MIP-2 im Serum oder der Peritonealflüssigkeit der Versuchstiere, so findet man signifikant erhöhte Aktivitäten.

Tabelle 1: Anzahl von Granulozyten und Makrophagen nach intraperitonealer Injektion

Experiment	Injektion	Maus	Granulozyten ($\times 10^6$) ¹⁾		Makrophagen ($\times 10^6$) ¹⁾	
			24 Std.	72 Std.	24 Std.	72 Std.
1	0,2 mg M. fermentans Protein mit 0,8 μ g MALP-2	A	4,1	1,3	0,7	3,67
		B	1,1	1,2	0,96	4,19
		C	4,5	1,4	1,6	3,83
2	0,5 mg Liposomen mit 8 μ g MALP-2	A	7,87	1,1		3,6
		B	11,18	0,49		4,9
		C	6,5	0,27		2,7
3	8 μ g MALP-2	A	3,08	1,12		
		B	1,72	1,49		
		C	7,62	1,97		
4	8 μ g MALP-2	A				6,2
		B				3,1
		C				7,7

1) Anzahl von Leukozyten in Kontroll-Mäusen (2 Std. NaCl):

Granulozyten $< 5 \times 10^4$

Makrophagen $1,2 - 2,2 \times 10^6$

Beispiel 2:

Auch durch Injektion von z. B. 15 μ g Endotoxin Lipopolysaccharid aus *Salmonella typhimurium* kann Einströmen von Leukozyten erreicht werden, jedoch leiden die Versuchstiere unter dieser Behandlung. Dies ist nicht zuletzt auf einen meßbaren Anstieg an Tumor Nekrose Faktor- α (TNF) im Serum der Tiere zurückzuführen. Es wurde im Serum der Endotoxin-behandelten Tiere nach 1,5 Std. zwischen 2500 und 40000 pg/ml TNF gemessen (Kochsalz behandelte Kontrolltiere < 250 pg/ml). Dagegen wurde nach Anwendung der Mykoplasma-Präparate in dem oben genannten Beispiel 1 kein signifikanter Anstieg an TNF gegenüber Kontrolltieren gemessen.

Referierter Stand der Technik

1. Quentmeier et al. in Infect. Immun., 58 (1990) 1273-1280,
2. Mühlradt & Frisch in Infect. Immun., 62 (1994) 3801-3807.
3. Mühlradt & Schade in Infect. Immun., 59 (1991) 3969-3974.

4. Metzger et al. in Int. J. Pep. Protein Res., 38 (1991) 545-554.
5. Metzger et al. in J. Pept. Sci., 3 (1995) 184-190.
6. Mühlradt et al. in J. Exp. Med., 185 (1997) 1951-1958

18. Mai 1998/h1

Unser Zeichen: 9256
Neue deutsche Patentanmeldung
Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (GBF)
Mühlradt & Deiters; Wundbehandlung

Patentansprüche

1. Pharmazeutisches Präparat zur Tier- oder Human-Wundbehandlung, enthaltend ein oder bestehend aus einem physiologisch verträglichen Lipopeptid oder Lipoprotein, das N-terminal eine Dihydroxypropyl-cystein-Gruppe mit zwei esterartig gebundenen gegebenenfalls langkettigen Fettsäuren trägt, die gleich oder verschieden sein können.
2. Präparat nach Anspruch 1, **gekennzeichnet** durch ein wasserlösliches Lipopeptid oder Lipoprotein.
3. Präparat nach Anspruch 1 oder 2, dadurch **gekennzeichnet**, daß das Peptid die folgende Aminosäuresequenz (I):

¹³
DhcGNNDESNISFKEK



oder eine Aminosäuresequenz aufweist, die mit der Sequenz (I) mit der Ausnahme identisch ist, daß N-terminal die Aminosäuren an Positionen 2 und gegebenenfalls 3 fehlen und/oder C-

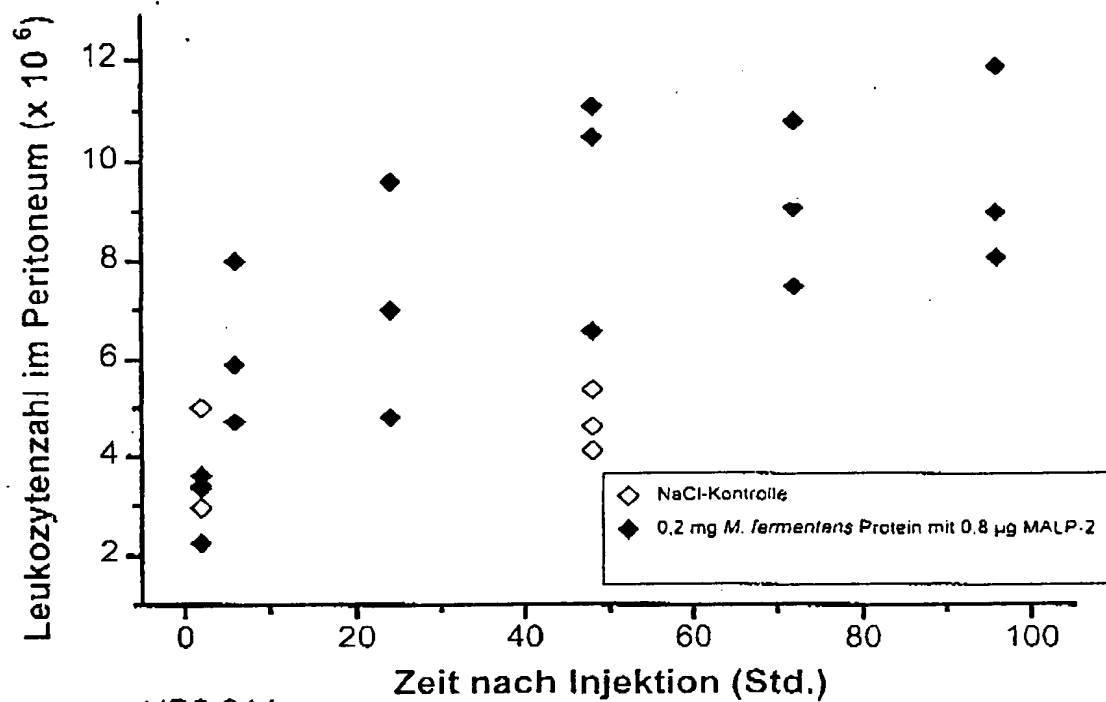
terminal 1 bis 2 Aminosäuren deletiert sind.

4. Präparat nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **gekennzeichnet** durch ein S-(2,3-Dihydroxypropyl)-cystein-Peptid, wobei die beiden Fettsäurereste die Formel R-CO- besitzen, wobei R eine C₇₋₂₅-Alkyl-, C₇₋₂₅-Alkenyl- oder C₇₋₂₅-Alkinylgruppe ist, wobei ungesättigte Reste vorzugsweise in cis-Konfiguration vorliegen.
5. Präparat nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch **gekennzeichnet**, daß es in Form einer Salbe, einer Lotion, einer wäßrigen Suspension oder eines Pflasters vorliegt.
6. Präparat nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch **gekennzeichnet**, daß das Lipopeptid oder Lipoprotein in ein Liposom eingebaut ist.
7. Präparat nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch **gekennzeichnet**, daß das Lipopeptid oder Lipoprotein synthetisch hergestellt oder aus einem Mykoplasma-Klon isoliert worden ist, insbesondere einem Mykoplasma fermentans-Klon.
8. Pharmazeutisches Präparat zur Tier-Wundbehandlung, enthaltend einen oder bestehend aus einem abgetöteten Mykoplasma-Klon.
9. Präparat nach Anspruch 8, dadurch **gekennzeichnet**, daß es sich um einen hitze-getöteten Mykoplasma-Klon und/oder einen Mykoplasma fermentans-Klon handelt.

Zusammenfassung

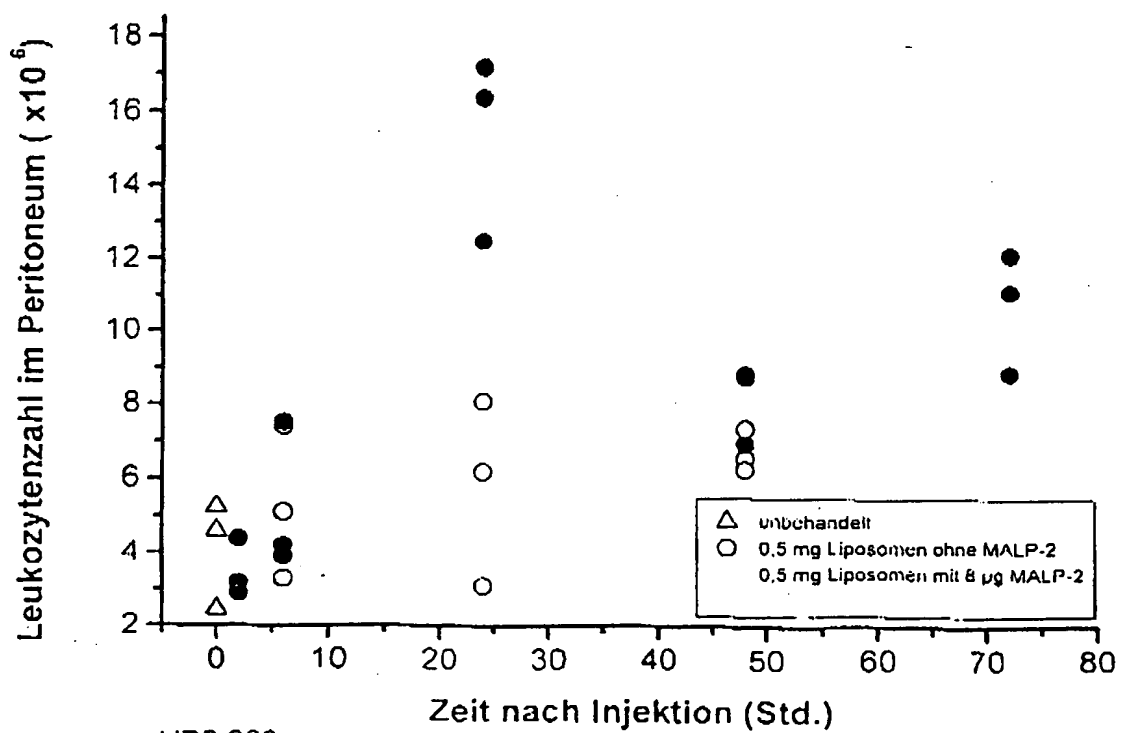
Die Erfindung betrifft ein pharmazeutisches Präparat zur Tier- oder Human-Wundbehandlung enthaltend einen oder bestehend aus einem Lipopeptid oder Lipoprotein, das N-terminal eine Dihydroxypropyl-cystein-Gruppe mit zwei esterartig gebundenen gegebenenfalls langkettigen Fettsäuren trägt.

Abb. 1



UD2-314

Abb. 2



UD2-260

Abb. 3

